



mikro RNA w patogenezie płaskonabłonkowych raków głowy i szyi

Marcin Szaumkessel¹, Krzysztof Szyfter^{1,2}

¹Instytut Genetyki Człowieka PAN, Zakład Mutagenезy Środowiskowej,
Poznań

²Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego,
Poznań

micro RNA in pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma

Summary

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth cancer in regard of both incidence and poor effect of treatment therapies, manifested in low cure rates (5-year survival rate – 50%). The molecular heterogeneity found in HNSCC is the main reason why the already published data has not been sufficient to develop reliable prognostic tests and efficient therapies.

A novel group of small non-coding RNA molecules (micro RNA or miRNA) has been identified and proved to be strongly involved in cancer. However, the existing data does not specifically address micro RNA involvement in HNSCC development and progression.

This report summarizes the state-of-art concerning miRNA research in head and neck cancer and provides a list of miRNAs potentially involved in HNSCC pathogenesis.

Key words:

miRNA, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), gene expression alterations.

Adres do korespondencji

Marcin Szaumkessel,
Instytut Genetyki
Człowieka,
Polska Akademia Nauk,
ul. Strzeszyńska 32,
60-479 Poznań;
e-mail:
marcinsz@man.poznan.pl

1. Wprowadzenie

W hipotezie świata RNA wskazuje się na RNA jako podstawę funkcjonowania środowiska ożywionego i przekonuje się, że jego istnienie poprzedzało informację genetyczną zawartą w formie DNA oraz struktur białkowych. Istotny jest fakt, że RNA jest

w stanie „przechowywać” informacje, posiada aktywność enzymatyczną, jak również może być przepisany na DNA oraz sekwencję aminokwasową białek, podczas gdy DNA nie potrafi sam replikować bez maszynerii enzymatycznej; te same ograniczenia dotyczą również białek (1).

2. miRNA – nowa klasa RNA

Znany od wielu lat kanon funkcjonalności RNA (informacyjne – mRNA, transportowe – tRNA, rybosomowe – rRNA oraz katalityczne rybozymy) z początkiem lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku rozszerzony został odkryciem niskocząsteczkowych, jednoniciowych struktur RNA, a mianowicie mikro RNA (miRNA, miR). Pierwsza cząsteczka miRNA (*lin-4* regulująca gen *lin-14* odpowiedzialny za prawidłowy wzrost i podział komórek u nematody *Caenorhabditis elegans*) została wyodrębniona i opisana przez zespół Victora Ambrosa w 1993 r. (2). Cząsteczka RNA niekodująca białek, a zdolna wpływać regulacyjnie na inne sekwencje, przez kilka lat pomijana jako anomalia, doczekała się uznania i zaliczenia do zupełnie nowej grupy RNA dopiero po 2001 r., kiedy to w kolejnych badaniach wykazano bogactwo podobnych struktur i ich aktywności (3-5).

mikro RNA (głównie stosowane skróty: miR, mir, miRNA) stanowi ważną grupę krótkich (około 22-nukleotydów), niekodujących cząsteczek RNA, które licznie występują we wszelkich organizmach roślinnych jak i zwierzęcych począwszy od pierwotniaków, a kończąc na człowieku (6). Aktualnie znanych jest już ponad 10 000 różnego rodzaju niekodujących RNA, z czego w genomie człowieka rozpoznano już występowanie ponad 700 miRNA (7). Szybko stało się jasne, że miRNA tworzą zupełnie nową klasę niekodujących cząsteczek, a ich biologiczne funkcje stanowią skomplikowany system o charakterze regulacyjnym, w pozytywnej jak i negatywnej relacji do kontrolowanych sekwencji mRNA. Tym samym odkrycie i opisanie miRNA wprowadziło kolejny poznany poziom regulacji w układach ekspresyjnych.

Z uwagi na specyfikę miRNA w ich sekwencji przy końcu 5' wyróżnia się tzw. 'seed' (2-8 nukleotydów), czyli rdzeń miRNA, utrwalony w toku ewolucji. Jest to główny element, w pełni komplementarny do miejsca rozpoznawanego w sekwencji genu regulowanego (8). miRNA dzięki sekwencji rdzeniowej rozpoznają docelowe miejsca wiązania w regionach 3'UTR danych genów i wiążą się z nimi na podstawie różnego stopnia komplementarności. W najnowszych doniesieniach wskazuje się również na możliwość nie w pełni komplementarnego wiązania się miRNA w obrębie sekwencji kodującej aminokwasy (ang. CDS-*Amino Acid Coding Sequence*) (9), jak również w regionie 5'UTR transkryptów mRNA (10,11). Na podstawie nowoczesnej techniki komputerowego przewidywania potencjalnych sekwencji rozpoznawanych przez miRNA, jak i technikach opartych na mikromacierzach ekspresyjnych oraz spektrometrii masowej można ocenić, że każda cząsteczka miRNA zdolna jest przyłączać i potencjalnie regulować od kilku do kilkuset różnych sekwencji. Szacuje

się również, że liczba genów kodujących białka będących pod regulacją miRNA może wynieść nawet 30% (12,13). Dzięki uzyskanym dotychczas wynikom można stwierdzić, że ekspresja miRNA wykazuje dość specyficzne wzory w stosunku do etapu rozwojowego i obejmuje m.in. specyficzność tkankową. Wykazano również występowanie zmian ekspresji miRNA specyficznych dla typu i stadium danej choroby (14).

3. Biogeneza miRNA

Geny miRNA są zlokalizowane w sekwencjach międzygenowych, jak również w obrębie eksonów lub intronów sekwencji kodujących. Często ulegają jednoczesnej transkrypcji wraz z genem, wewnątrz którego są usytuowane oraz nierzadko dzielą wspólny promotor (6,15-17). U człowieka synteza miRNA przebiega w dwóch odrębnych etapach: pierwszy w jądrze komórkowym, a drugi w cytoplazmie. Polimeraza RNA II syntetyzuje odcinki RNA, które mogą zawierać sekwencje nawet kilku miRNA (do 1000 par zasad (pz)), pochodzących z jednej „rodziny” i podlegające wspólnej regulacji. Powstająca w ten sposób cząsteczka RNA układa się w nieregularne struktury drugorzędowe typu spinki do włosów (ang. *hairpin*) i nazywana jest pri-miRNA. Na końcach 5' oraz 3' chroniona jest podobnie jak mRNA kodujące białka. Pierwszy etap dojrzewania przeprowadza rybonukleaza III (Drosha) we współpracy z białkiem DiGeorge (ang. *Syndrome Critical Region Gene 8 /DGCR8*) wraz z innymi kofaktorami reakcji m.in. helikazami RNA p68/DDX5 i p72/DDX17, tworzącymi kompleks enzymatyczny zwany Mikroprocesorem (18-20). Powstałe pre-miRNA, o długości do 100 nukleotydów, jest transportowane do cytoplazmy za pomocą kompleksu Eksportyna-5/białko Ran-GTP (20). Do pre-miRNA przyłącza się rybonukleaza III (Dicer), która we współpracy z kofaktorami (białkiem Argonaute /Ago/ białko wiążące TAR /TRBP/ lub PACT) formuje dojrzałe dupleksy miRNA o długości około 20-22 nukleotydów (21,22). Z kolei jedna z nici nazywana przewodzącą (ang. *guide*), która jest termodynamicznie mniej stabilna, zwłaszcza od końca 5' sekwencji, jest inkorporowana do rybonukleoproteinowego kompleksu efektorowego zwanego miRISC (*miRNA-Induced Silencing Complex*), również znane jako miRNP (*miRNA Ribonucleoprotein Complex*), w którym uzyskuje aktywność biologiczną (23).

4. Mechanizmy działania miRNA

Postuluje się istnienie kilku mechanizmów, za pośrednictwem których miRNA wpływa na modulację ekspresji mRNA. Pierwszy związany jest z blokowaniem inicjacji translacji poprzez związanie miRISC z mRNA, co uniemożliwia przyłączenia elementów rybosomowych głównych w procesie biosyntezy białek (24). Inną drogą za-

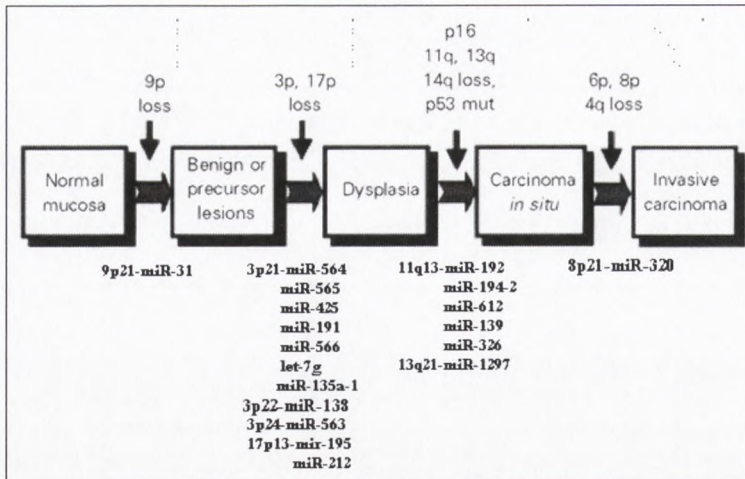
blokowania translacji jest kompetycja z czynnikami inicjatorowymi translacji (np. EIF6) (25) oraz przez blokowanie białka PABP (*Poly(A) Binding Protein*) i skrócenie ogona poli(A) (26). miRNA może również blokować syntezę białka już w czasie „biegnącej” translacji i powodować jednoczesną degradację łańcucha polipeptydowego zanim zakończy się jego synteza (27). Z kolei nie w pełni komplementarne przyłączenie miRNA do mRNA powodować może skierowanie mRNA do degradacji np. do ciałek P (ang. *processing bodies*), które zlokalizowane są w pobliżu kompleksu miRISC (28).

5. Płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi (HNSCC)

Płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi (HNSCC, ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*) stanowią specyficzną, heterogenną grupę nowotworów rozwijających się zazwyczaj miejscowo, ze zmutowanego nabłonka górnych dróg oddechowych (29), a połowa wszystkich rejestrowanych przypadków w Polsce dotyczy raków krtani (30). Co ciekawe, ze względu na uwarunkowania etiologiczne w Azji Południowo-Wschodniej przeważa rak nosogardzieli, z kolei w Europie Zachodniej najczęściej rozpoznaje się nowotwory jamy ustnej. Podłoże powstawania HNSCC jest silnie uwarunkowane czynnikami środowiskowymi takimi jak nadużywanie mocnych napojów alkoholowych, palenie tytoniu, kancerogenne substancje chemiczne (m.in. chrom, nikiel, benzydyna, benzen) (31-33) oraz zakażenia wirusem EBV (34) i HPV (35). Czynniki genetyczne mogące predysponować do HNSCC skupiają się wokół genów naprawy DNA oraz enzymów metabolizujących kancerogeny wchłaniane przez nabłonek dróg oddechowych. Pomimo postępów w dziedzinie medycyny i genetyki od dziesięcioleci brak jest istotnej poprawy wskaźnika 5-letnich przeżyć (około 50%), a podstawową terapię w przypadku HNSCC stanowi leczenie skojarzone obejmujące operacyjną resekcję guza oraz radio- i chemioterapię. U pacjentów leczonych z powodu HNSCC często rozwijają się drugie nowotwory pierwotne, jak i wznovy pooperacyjne, co znacząco pogarsza rokowania (36,37). Patogeneza molekularna HNSCC wciąż pozostaje słabo poznana, pomimo znacznego postępu w identyfikacji czynników supresorowych oraz onkogenów biorących udział w procesie kancerogenezy. Wciąż brakuje skutecznych markerów dla testów prognostycznych i diagnostycznych, pozwalających na szybką identyfikację typu choroby, jej periodyzację i indywidualizację leczenia.

6. miRNA jako supresor albo onkogen

Oddziaływanie niekodujących RNA na geny biorące udział w różnorodnych procesach biologicznych obejmuje szeroki zakres aktywności począwszy od kontroli różnicowania komórek, wzrostu, naprawy DNA po kierowanie komórki na drogę



Rys. 1. Model progresji płaskonabłonkowych nowotworów głowy i szyi (HNSCC) (zmodyfikowany, [57]) oraz geny miRNA zlokalizowane w loci najczęściej ulegającym aberracjom (wg MiRNome oraz miRbase release 14.0, wrzesień 2009). MiRNA znajdujące się w obrębie zmian mogą potencjalnie być zaangażowane w proces kancerogenezy.

apoptozy (38-40). Sugeruje to ich ścisły związek z przebiegiem procesu kancerogenezy. Istotnym wsparciem tych przypuszczeń jest fakt występowania dużej liczby genów miRNA w punktach złamań chromosomów, sekwencjach deletowanych lub amplifikowanych, co podczas transformacji nowotworowej powoduje implikacje funkcjonalne (41,42). Następstwem tych aberracji jest nadmiar lub brak obecności konkretnych miRNA w transformowanej komórce, a co za tym idzie, upośledzony jest mechanizm kontroli prawidłowej ekspresji wielu genów. Gdy miRNA w prawidłowej komórce oddziałuje na dany onkogen inaktywując go, to w przypadku delekcji genu miRNA produkt onkogeny ulega wzmożonej produkcji. Przeciwnie, nadmierna amplifikacja genu miRNA, który reguluje supresor nowotworowy powoduje jego blokadę i również otwarcie drogi do kancerogenezy. Tak zatem miRNA mogą funkcjonować zarówno jako onkogeny lub geny supresji nowotworowej (43,44). Dotychczas większość badań nad miRNA w nowotworach jest oparta na zmianach poziomów ekspresji, poszukiwaniach specyficznego wzoru dla danej grupy chorób i wyłanianiu tzw. „kancerogennych miRNA” (45). Skutkiem ogromnego zainteresowania funkcjonowaniem miRNA w procesach nowotworzenia są liczne doniesienia o istotnych zależnościach pomiędzy zmianami w profilach ekspresji genów miRNA a charakterystyką kliniczną danej choroby (np. czasem przeżycia, podtypem raka, przerzutami itp.). Dzięki temu powstaje nowa grupa czynników prognostycznych, które mogą znacznie poprawić czas i jakość diagnostyki i leczenia, a także przyczynić się do rozwoju testów przesiewowych dla profilaktyki.

Pierwszymi miRNA opisanymi w roli supresora były *miR-15a* i *miR-16a* zlokalizowane w ramieniu 13q14, w regionie, który u ponad 50% pacjentów z przewlekłą białaczką

szpikową (B-CLL) ulega delecji. Są to jedyne znane geny w danym fragmencie, a co więcej, biorą udział w regulacji antyapoptotycznego genu BCL-2. U wszystkich pacjentów z B-CLL wykryto brak lub bardzo niską ekspresję *miR-15a* i *miR-16a* (46). Generalnie w przypadkach raka obserwuje się obniżoną ekspresję genów miRNA, co może predysponować do niekontrolowanego rozwoju choroby. Kolejnym przykładem może być specyficznie utracona ekspresja *miR-126*, która w rakach płuc i kości wzmacnia wzrost guza i proliferację, a *miR-335* potęguje przerzutowanie i jest jego markerem w rakach piersi (47). Z kolei *let-7* jest regulatorem poznanego dobrze onkogenu RAS (zmutowanego w 15-30% wszystkich nowotworów), odpowiedzialnego za wzrost i różnicowanie komórek. W rakach płuc w przypadku nadekspresji RAS jednocześnie obserwuje się niską ekspresję *let-7*, a tym samym niekontrolowany wzrost i rozwój guzów płuc (48).

7. miRNA w nowotworach głowy i szyi

Płaskonabłonkowe nowotwory głowy i szyi jako zróżnicowana grupa chorób o wieloczynnikowym podłożu stanowi ciekawy przedmiot badań pod kątem zjawiska interferencji RNA. Kilukrotnie przeprowadzono profilowanie ekspresji wszystkich znanych genów miRNA w liniach komórkowych wyprowadzonych z nowotworów głowy i szyi oraz w guzach pierwotnych pobranych od pacjentów, w celu wyłonienia grupy tych niekodujących miRNA, które wykazują największe odchylenia w poziomach ekspresji w odniesieniu do grupy kontrolnej. Na bazie mikromacierzy DNA Chang i wsp. (49) przeanalizowali panel 646 znanych miRNA w 4 przypadkach guzów pierwotnych oraz w 4 liniach komórkowych w odniesieniu do zdrowego nabłonka. Wykazano zmienioną ekspresję kilku miRNA: *miR-21*, *let-7*, *18*, *29c*, *142-3p*, *155*, *146b* (nadekspresja) oraz *miR-494* (obniżona ekspresja). Najbardziej zmieniony wzór ekspresji występował w przypadku *miR-21* oraz *miR-494*, co potwierdzono metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Sugerowana rola *miR-21* jest związana z kontrolą wzrostu komórkowego oraz udziałem w aktywacji apoptozy na drodze uwalniania cytochromu c. Rola cząsteczki *miR-494* nie była wcześniej opisana, ale autorzy postulują jego współmierny udział w regulacji wzrostu komórek.

Również na podstawie mikromacierzy DNA Avissar i wsp. (50) wskazał na obniżoną ekspresję *miR-221* oraz *miR-375* jako najbardziej specyficzne i istotnie zmiany w HNSCC. Temu efektowi przypisano największy potencjał predykcyjny, podkreślając jednocześnie, że linie komórkowe nie są właściwym obiektem badań miRNA, bowiem guzy pierwotne lepiej odzwierciedlają status choroby. Jednakże w odniesieniu do prac innych badaczy linie komórkowe wciąż pozostają w obrębie intensywnego zainteresowania co odzwierciedlone zostało w publikowanych wynikach, które bardzo często są wskaźnikiem zmian obserwowanych w guzach pierwotnych.

W późniejszej pracy (51) z wykorzystaniem techniki qRT-PCR i szerszej grupy guzów pierwotnych wykazano korelację wzrostu ekspresji *miR-375* wraz ze wzrostem

spożycia mocnych napojów alkoholowych, a z kolei wysoka ekspresja *miR-21* korelowała z istotnie niższymi 5-letnimi przeżyciami pacjentów.

Podobną techniką analizy posłużył się Tran i wsp. (52), badając panel 261 miRNA w 9 liniach komórkowych raków głowy i szyi. Wyłoniono 33 miRNA o podwyższonej oraz 22 o obniżonej ekspresji. W dalszej kolejności za pomocą techniki Northern Blot potwierdzano najistotniejsze zmiany dla: *let7-a*, *miR-16*, *miR-21* i *miR-205* (wskazujące na zwiększoną ekspresję) oraz *miR-342*, *miR-346* i *miR-373* (wykazujące obniżoną ekspresję w liniach komórkowych). W rezultacie w przypadku *miR-21* wykazano najistotniejszą zmianę ekspresji. Autorzy sugerują, że *miR-21* jest specyficzny dla chorób nowotworowych oraz potencjalnie reguluje wiele genów związanych z procesem nowotworzenia, m.in. *PLAG-1*, *HIC2*, *ADNP*, *KIF1B*, *HMG2*. Z kolei *miR-205* uznano jako specyficznie regulowany w HNSCC i zasugerowano wzięcie go pod uwagę jako markera dla tej grupy nowotworów.

Profilowanie ekspresji znanych miRNA w grupie guzów pierwotnych HNSCC wykonane przez Childsa i wsp. (53) było również oparte na mikromacierzach ekspresyjnych. W rezultacie wyznaczono dwa geny miRNA o największej zmienności: *miR-205* i *let-7d*. *miR-205* charakteryzujący się niską ekspresją według autorów związany jest z lokalnymi wznosami niezależnymi od pierwotnej agresywności choroby. Natomiast *miR-205* i *let-7d* (wspólnie) przy niskich wartościach ekspresji korelują z krótszym czasem przeżycia pacjentów.

Istotną kwestią sprawiającą wiele problemów klinicytom jest przerzutowanie guzów. Znalezienie odpowiedniego markera dla określania przypadków przerzutowania jest zagadnieniem poruszonym od dawna. Fletcher i wsp. (54) na podstawie techniki qRT-PCR analizował zmienność ekspresji *miR-205* w próbach różnie umiejscowionych nowotworów złośliwych oraz guzów łagodnych. Ekspresja *miR-205* wykazała specyficzność nie tylko dla nowotworów płaskonabłonkowych, ale także zróżnicowanie ekspresji pomiędzy próbkami z przerzutami i bez oznak przerzutów. Co więcej, możliwe było wykrycie bardzo niewielkiej ilości komórek metastatycznych (1 kom. epitalialna na 1 milion limfocytów), co może przynieść znaczący zysk terapeutyczny.

W innym doniesieniu zmniejszoną ekspresję *miR-138* i podwyższoną *miR-566* obserwowano we wszystkich liniach komórkowych wyprowadzonych z materiału przerzutowego. W dodatkowej analizie wskazano na *miR-138* jako związanego z inwazyjnością, regulacją cyklu komórkowego oraz apoptozą. Sugeruje się uznanie genu *miR-138* jako supresora nowotworowego (55).

Zmiany w mikrośrodowisku komórek mogą znacznie różnicować ekspresję poszczególnych genów. Badania przeprowadzone przez Herberta i wsp. (56) dotyczyły regulacji genu *HMG2A* (*High Mobility Group A2 Gene*). *HMG2A* jest odpowiedzialny za reagowanie komórki na działanie takich związków genotoksycznych jak doxorubicyna i cisplatyna. Autorzy demonstrują jak zmienione warunki tlenowe oddziałują na modulację ekspresji różnych miRNA. Ponadto, wskazują *miR-98* jako regulator *HMG2A* w nowotworach głowy i szyi. Ekspresja miRNA jest zatem zróżnicowana

w zmiennych mikrośrodkowiskach (specyficznych dla nowotworów) i może wpływać na przebieg kancerogenezy.

W tabeli przedstawiono wykaz najważniejszych prac związanych z profilowaniem ekspresji miRNA w płaskonabłonkowych nowotworach głowy i szyi (HNSCC) oraz liniach komórkowych wyprowadzonych z przypadków HNSCC. MiRNA które najczęściej ulegają zmianom w poziomie ekspresji to *miR-21* oraz *miR-205*, których znaczenie może być istotne w świetle poszukiwania nowych markerów w tej grupie chorób.

Tabela

Wykaz najważniejszych prac związanych z profilowaniem ekspresji miRNA

Literatura	Grupa badana	Metoda	MikroRNA o zmienionej ekspresji	Znaczenie funkcjonalne wg autora
1	2	3	4	5
B. C. Christensen et al. (2009)	guzy pierwotne HNSCC	Taqman® allelic discrimination	<i>Let-7</i> ↓ (rodzina)	<i>Let-7</i> reguluje KRAS-LCS6 którego wariant koreluje z gorszym rokowaniem pacjentów z rakiem jamy ustnej
X. Liu et al. (2009)	metastatyczne linie komórkowe z HNSCC	mikromacierze	<i>miR-138</i> ↓ <i>miR-566</i> ↑	Dla <i>miR-138</i> (niska) i <i>miR-566</i> (wysoka) ekspresja obecna w metastatycznych liniach kom. <i>miR-138</i> ma wpływ na inwazyjność, cykl komórkowy oraz apoptozę w HNSCC
M. Avissar et al. (2009)	guzy pierwotne HNSCC, prawidłowy nabłonek oraz linie komórkowe HNSCC	mikromacierze. Walidacja: qRT-PCR	<i>miR-21</i> ↑ <i>miR-221</i> ↓ <i>miR-375</i> ↓	<i>miR-221</i> i <i>miR-375</i> i ich wysoka specyficzność w HNSCC mogą być uważane za nowe biomarkery prognostyczne <i>miR-21</i> -wysoka ekspresja oznaczała niższe 5-letnie przeżycia wśród pacjentów
S. Chang et al. (2008)	4 guzy pierwotne HNSCC; 4 prawidłowe próby z nabłonka ust; 4 linie komórkowe HNSCC	mikromacierze GenoExplorer™ Walidacja: qRTPCR	<i>mir-21</i> ↑ <i>mir-155</i> ↑	<i>miR-21</i> reguluje wzrost komórkowy oraz apoptozę
G. Childs et al. (2009)	guzy pierwotne HNSCC	mikromacierze	<i>let-7d</i> ↓ <i>miR-21</i> ↑ <i>miR-1</i> ↑, <i>miR-133a</i> ↑, <i>miR-205</i> ↓	<i>miR-205</i> – niska ekspresja związana jest z lokalnymi wznowami niezależnie od agresywności choroby

1	2	3	4	5
				<i>miR-205 i let-7d</i> (w kombinacji) – ich obniżona ekspresja koreluje z gorszym czasem przeżycia pacjentów
A. Fletcher et al. (2008)	kilka linii kom. z różnych lokalizacji głowy i szyi, białaczki T-LL i normalnych keratynocytów jamy ustnej, 12 guzów złośliwych (HNSCC) oraz 7 łagodnych (jama ustna)	qRT-PCR	<i>miR-205</i>↓	<i>miR-205</i> – potencjalny marker płaskonabłonkowych nowotworów oraz stopnia ich przerzutowania
C. Hebert et al. (2007)	linie komórkowe HNSCC	mikromacierze oraz Western blott	Wysoka ekspresja <i>miR-572, -214, -563, -637, -628, -191, -210, -498, -373, -98, -148b, -15a, -148-a, -200a, -30b, -429, -7, hsa-let-7e, -7i, i-7g miR-98</i> Niska ekspresja: <i>miR-22a, -565, -195, -30e-5p, -374, -19a, -101, -424, -29b, -186, -141, -320, -422b, i -197</i>	<i>miR-98</i> – reguluje HMG2A (modulator genotoksycznej odpowiedzi na doxorubicynę i cisplatinę)
N. Tran et al. (2007)	9 linii komórkowych HNSCC	mikromacierze	<i>miR-205</i>↓ <i>miR-21</i> ↑	<i>miR-21</i> – specyficzny w nowotworach (potencjalnie reguluje PLAG-1, HIC2)
J. Jiang et al. (2005)	32 linie komórkowe z różnych nowotworów (w tym HNSCC)	mikromacierze. Walidacja: RT-PCR Taqman i SYBRgreen	<i>miR-205</i>↓ <i>miR-21</i>↑	<i>miR-205</i> i <i>miR-21</i> wykazały nadekspresję w liniach HNSCC. miRNA cechuje tkankowa specyficzność

Na podstawie badań opublikowanych do tej pory dotyczących profilowania ekspresji znanych miRNA w nowotworach głowy i szyi, jak się wydaje, najczęstsze i najistotniejsze zmiany zachodzą w przypadku dwóch genów *miR-21* oraz *miR-205*. Często wykrywana nadekspresja obu z nich, nie tylko w HNSCC, ale obserwowana także w innych typach nowotworów sugeruje ich ważną rolę w procesie kancerogenezy.

8. Wnioski

Podsumowując, istniejący stan wiedzy na temat zaangażowania miRNA w procesy patologiczne wykazuje, że odkryta względnie niedawno regulacyjna funkcja miRNA rozciąga się także na proces onkogenezy w nowotworach głowy i szyi. Precyzyjne ustalenie roli poszczególnych miRNA stwarza nowe możliwości diagnostyczne i potencjalnie terapeutyczne. Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że technologie oparte na interferencji RNA będą jednymi ze skuteczniejszych narzędzi w medycynie przyszłości.

Literatura

1. Ganem B., (1987), *Nature*, 328, 676.
2. Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V., (1993), *Cell*, 75, 843-854.
3. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T., (2001), *Science*, 294, 853-858.
4. Lau N. C., Lim L. P., Weinstein E. G., Bartel D. P., (2001), *Science*, 294, 858-862.
5. Lee R. C., Ambros V., (2001), *Science*, 294, 862-864.
6. Bartel D. P., (2004), *Cell*, 116, 281-297.
7. Griffiths-Jones S., Saini H. K., van Dongen S., Enright A. J., (2008), *Nucleic Acids Res*, 36, D154-158.
8. Doench J. G., Sharp P. A., (2004), *Genes Dev.*, 18, 504-511.
9. Tay Y., Zhang J., Thomson A. M., Lim B., Rigoutsos I., (2008), *Nature*, 455, 1124-1128.
10. Lytle J. R., Yario T. A., Steitz J. A., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 9667-9672.
11. Jopling C. L., (2008), *Biochem. Soc. Trans.*, 36, 1220-1223.
12. Selbach M., Schwanhauser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R., Rajewsky N., (2008), *Nature*, 455, 58-63.
13. Thomson J. M., Parker J. S., Hammond S. M., (2007), *Methods Enzymol.*, 427, 107-122.
14. Olson P., Lu J., Zhang H., Shai A., Chun M. G., Wang Y., Libutti S. K., Nakakura E. K., Golub T. R., Hanahan D., (2009), *Genes Dev.*, 23, 2152-2165.
15. Altuvia Y., Landgraf P., Lithwick G., Elefant N., Pfeffer S., Aravin A., Brownstein M. J., Tuschl T., Margalit H., (2005), *Nucleic Acids Res.*, 33 (8), 2697-2706.
16. Baskerville S., Bartel D. P., (2005), *RNA*, 11(3), 241-247.
17. Alvarez Marcos C. A., Llorente Pendas J. L., Franco Gutierrez V., Hermsen M. A., Franco Albalad M. P., Fernandez Espina H., Suarez Nieto C., (2006), *Acta Otorrinolaringol Esp.*, 57, 462-466.
18. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V. N., (2003), *Nature*, 425(6956), 415-419.
19. Cai X., Hagedorn C. H., Cullen B. R., (2004), *RNA*, 10, 1957-1966.
20. Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R., (2003), *Genes Dev.*, 17, 3011-3016.
21. Zisoulis D. G., Lovci M. T., Wilbert M. L., Hutt K. R., Liang T. Y., Pasquinelli A. E., Yeo G. W., (2010), *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17, 173-179.
22. Macrae I., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A., Cande W., Adams P., Doudna J., (2006), *Science*, 311 (5758), 195-198.
23. Chandrimada T. P., Finn K. J., Ji X., Baillat D., Gregory R. I., Liebhaber S. A., Pasquinelli A. E., Shiekhhattar R., (2007), *Nature*, 447, 823-828.
24. Humphreys D. T., Westman B. J., Martin D. I., Preiss T., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 169-61-16966.
25. Jackson R. J., Standart N., (2007), *Sci. STKE*, 367, p. re1.
26. Zhao S., Liu M. F., (2009), *Sci. China C Life Sci.*, 52, 1111-1116.
27. Salzman D. W., Shubert-Coleman J., Furneaux H., (2007), *J. Biol. Chem.*, 282, 32773-32779.

28. Pillai R. S., Bhattacharyya S. N., Artus C. G., Zoller T., Cougot N., Basyuk E., Bertrand E., Filipowicz W., (2005), *Science*, 309, 1573-1576.
29. Sobin L. H., Wittekind C., (2002), *TNM Classification of Malignant Tumors*, 6th ed., New Jersey, John Wiley & Sons.
30. Jaworowska E., Serrano-Fernández P., Tarnowska Cz., Lubinski J., Kram A., Masojc B., Scott R., Lubinski J., (2007), *Cancer Detection and Prevention*, 31(4), 270-275.
31. Boffetta P., Nyberg F., (2003), *British Medical Bulletin*, 68, 71-94.
32. Gawecki W., Kostrzewska-Poczekaj M., Gajecka M., Milecki P., Szyfter K., Szyfter W., (2007), *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 264, 1459-1465.
33. Szyfter K., Wierzbicka M., Giefing M., Rydzanicz M., (2005), *Przegl. Lek.*, 62, 1151-1153.
34. Goldenberg D., Golz A., Netzer A., Rosenblatt E., Rachmiel A., Goldenberg R. F., Joachims H. Z., (2001), *Am. J. Otolaryngol.*, 22, 197-205.
35. Psyrrri A., Gouveris P., Vermorken J. B., (2009), *Curr. Opin. Oncol.*, 21, 201-205.
36. Jones A., Morar P., Phillips D., Field J., Husband D., Helliwell T., (1995), *Cancer*, 75 (6), 1343-1353.
37. Giefing M., Rydzanicz M., Szukala K., Wozniak A., Wierzbicka M., Szyfter K., Kujawski M., (2005), *Neoplasma*, 52, 374-380.
38. Chan S. P., Slack F. J., (2007), *Dev. Cell.*, 13, 605-607.
39. Xu P., Guo M., Hay B. A., (2004), *Trends Genet.*, 20, 617-624.
40. Crosby M. E., Kulshreshtha R., Ivan M., Glazer P. M., (2009), *Cancer Res.*, 69, 1221-1229.
41. Calin G. A., Sevignani C., Dumitru C. D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M. et al., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2999-3004.
42. Huppi K., Volfovsky N., Mackiewicz M., Runfola T., Jones T. L., Martin S. E., Stephens R., Caplen N. J., (2007), *Semin. Cancer Biol.*, 17, 65-73.
43. Calin G. A., Croce C. M., (2006), *Nat. Rev. Cancer*, 6, 857-866.
44. Esquela-Kerscher A., Slack F. J., (2006), *Nat. Rev. Cancer*, 6, 259-269.
45. Osada H., Takahashi T., (2007), *Carcinogenesis*, 28(1), 2-12.
46. Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., et al., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15524-15529.
47. Tavazoe S. F., Alarcon C., Oskarsson T., Padua D., Wang Q., Bos P. D., Gerald W. L., Massague J., (2008), *Nature*, 451, 147-152.
48. Johnson S. M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K. L., Brown D., Slack F. J., (2005), *Cell*, 120, 635-647.
49. Chang S. S., Jiang W. W., Smith I., Poeta L. M., Begum S., Glazer C., Shan S., Westra W., Sidransky D., Califano J. A., (2008), *Int. J. Cancer*, 123, 2791-2797.
50. Avissar M., Christensen B. C., Kelsey K. T., Marsit C. J., (2009), *Clin. Cancer Res.*, 15, 2850-2855.
51. Avissar M., McClean M. D., Kelsey K. T., Marsit C. J., (2009), *Carcinogenesis*, 30, 2059-2063.
52. Tran N., McLean T., Zhang X., Zhao C. J., Thomson J. M., O'Brien C., Rose B., (2007), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358, 12-17.
53. Childs G., Fazzari M., Kung G., Kawachi N., Brandwein-Gensler M., McLemore M., Chen Q., Burk R. D., Smith R. V., Prystowsky M. B., et al., (2009), *Am. J. Pathol.*, 174, 736-745.
54. Fletcher A. M., Heaford A. C., Trask D. K., (2008), *Transl. Oncol.*, 1, 202-208.
55. Liu X., Jiang L., Wang A., Yu J., Shi F., Zhou X., (2009), *Cancer Lett.*, 286, 217-222.
56. Hebert C., Norris K., Scheper M. A., Nikitakis N., Sauk J. J., (2007), *Mol. Cancer*, 6, 5.
57. Califano J., van der Riet P., Westra W., Nawroz H., Clayman G., Piantadosi S., et al., (1996), *Cancer Res.*, 56, 2488-2492.
58. Jiang J., Lee E.J., Guser Y., Schmittgen T.D., (2005), *Nucleic Acids Res.*, 33, 5394-5403.